

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP99/05302

28.09.99

E30

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

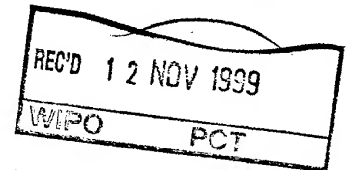
1998年 9月29日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第274574号

出願人
Applicant(s):

旭化成工業株式会社

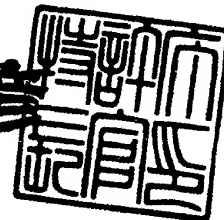


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3073489

【書類名】 特許願

【整理番号】 X10-01096

【提出日】 平成10年 9月29日

【あて先】 特許庁長官

【国際特許分類】 C12Q 3/00
C12Q 1/00

【発明の名称】 顆粒放出のコントロール方法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 瀬戸 実

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

【氏名】 福田 耕一郎

【特許出願人】

【識別番号】 000000033

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代表者】 山本 一元

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 顆粒放出のコントロール方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 顆粒放出能を有する細胞系に、カルグラニユリン活性を増加または減少せしめる処理をなし、次いで顆粒放出を増加または減少せしめることを特徴とする顆粒放出のコントロール方法。

【請求項 2】 顆粒放出能を有する細胞系が、温血動物由来の好中球または好中球様の培養細胞である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 カルグラニユリンがカルグラニユリン A、カルグラニユリン B またはその同属体である請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 a) 顆粒放出能を有する細胞系を薬剤にて処理し、高透過性細胞膜を有する当該細胞系を調整する；

b) 高透過性細胞膜を有する当該細胞系に各種濃度のカルグラニユリンおよび水可溶性カルシウムを添加し、温度湿度制御室内で適当な時間インキュベートする；

ついで

c) 放出された物質量を定量評価する；

ことを特徴とする当該細胞系からの顆粒放出反応をコントロールするために細胞内カルグラニユリン活性を変化させ顆粒放出反応を定量する方法。

【請求項 5】 顆粒放出能を有する細胞系が、温血動物由来の好中球または好中球様の培養細胞である請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 スクリーニングの対象となる物質を、請求項 4 に記載の定量系に存在させ、顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、顆粒放出能を有する細胞系、好ましくは好中球の顆粒放出をコントロールさせる方法およびそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する

薬剤のスクリーニング法に関する。

【0002】

【従来の技術】

好中球は、生体制御において重要な役割を果たしている。好中球の主な機能は、生体に進入した細菌・微生物に向かって遊走し、これら侵入物を貪食した後、殺菌することである。好中球の殺菌機構の一つは、食胞が顆粒と融合した後、顆粒内に存在する殺菌性蛋白質や蛋白分解酵素が作用して殺菌を行うことである。好中球内に存在する殺菌性蛋白質や蛋白分解酵素は重要な殺菌物質であるが、時としてその過剰産生・過剰放出が血管内膜を障害することが知られている (Fahey, T. J. ら、(1992) In Update Pulmonary Diseases and Disorders (Fishman AP, ed) MacGraw-Hill, New York)。

【0003】

血管内膜障害は成人呼吸窮迫症候群 (ARDS) (Weiland, J. E. ら、Am. Rev. Respir. Dis. (1986) 133:218-225)、虚血後再灌流障害 (Cavanagh, S. P. ら、Cardiovasc. Surg. (1998) 6:112-118)、糸球体腎症 (Jennette, J. C. and Falk, R. J.、Am. J. Kidney Dis. (1994) 24:130-141)、のう胞性線維症 (Greenberger, P. A.、J. A. M. A (1997) 278:1924-1930)、リウマチ性関節炎 (Chang, D. J. ら、Semin. Arthritis Rheum. (1996) 25:390-403)、慢性気管支炎 (Hoidal, J. R.、Semin. Respir. Infect. (1994) 9:8-12)、血管レン縮 (Merhi, Y. ら、Arterioscler. Thromb. (1993) 13:951-957)、喘息 (Borson, D. B. ら、Am. J. Physiol. (1991) 260:L212-L225)、末梢循環障害、狭心症 (Merhi, Y. ら、Arterioscler. Thromb. (1993) 13:951-957)、高血圧症 (Dzau, V. J.、Am. J. Med. (1984) 77:31-36)、動脈硬化 (

Belch, J. J.、Curr. Opin. Lipidol. (1994) 5 : 440-446) に深く関与している。したがって好中球の顆粒放出を阻害する薬物は好中球顆粒放出の関与するこれらの疾患に対する治療薬になりうると考えられる。

【0004】

しかし、現在、好中球の顆粒放出機構はほとんど不明である。好中球内のカルシウム濃度が上昇することが、顆粒放出には必須であることが知られているが、このカルシウム濃度上昇によって活性化され顆粒放出を惹起する分子は知られていない。よって現在まで、特異的な好中球放出阻害剤の開発は実施されていない。

【0005】

しかしこのカルシウム濃度上昇によって活性化される好中球内分子を特定し、その分子を阻害する化合物を探索することにより、これらの阻害剤が、上記、好中球顆粒放出の関与する疾患や現象、たとえば、成人呼吸窮迫症候群 (ARDS)、急性心筋梗塞時の虚血後再灌流障害、糸球体腎症、のう胞性線維症、リウマチ性関節炎、慢性気管支炎、脳血管レン縮、喘息、末梢循環障害、狭心症、高血圧症、動脈硬化に有効な予防および／または治療薬剤となると期待される。

【0006】

カルグラニュリンにはカルグラニュリンA (calgranulinA) (Burmeister, G.、Immunology (1986) 171:461-474) (S100A8, MRP8、p8、またはL1軽鎖等命名されている)、カルグラニュリンB (calgranulinB) (Burmeister, G.、Immunology (1986) 171:461-474) (S100A9, MRP14、p14またはL1重鎖等命名されている) およびカルグラニュリンC (calgranulinC) (Dell' Angelica, E. C.、J. Biol. Chem. (1994) 269:28929-28936) (S100A12またはp6等と命名されている) の3種類が存在する。

【0007】

カルグラニュリンAは分子量約8 kDのカルシウム結合蛋白質であり、カルグ

ラニュリンBはおよそ分子量約14 kDのカルシウム結合蛋白質であり、カルグラニュリンCは分子量約10 kDのカルシウム結合蛋白質であり、S100蛋白質に分類される。

カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBは1988年にE. Lagasseらによってクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている(E. Lagasse and R. G. Clerc, Mol. Cellular. Biol. (1988) 8, 2402-2410)。カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBは好中球および単球に特異的に存在し、好中球または単球に含まれる全蛋白質含量の約5%を占める。

【0008】

カルグラニュリンの細胞内での生理機能を示唆する知見として、カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが*in vitro*でカゼインキナーゼIおよびIIの活性を阻害すること(Murao, S. ら, J. Biol. Chem. (1989) 264: 8356-8360)が報告されている。

しかしながら、カゼインキナーゼIおよびIIの好中球および単球における生理的機能は現在の所不明である。よってカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBのカゼインキナーゼIおよびIIの活性制御を介した生理的意義は不明である。カルグラニュリンの細胞外での生理機能を示唆する知見として、カルグラニュリンAが好中球および単球の遊走活性を上昇させること(Geczy, C. L., Biochim. Biophys. Acta (1996) 1313: 246-253)、カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが抗菌活性を示すことなどが報告されている(Murthy, A. R. K. ら, J. Immunol. (1993) 151: 6291-6301)。

しかしながら好中球および単球の遊走活性を有するカルグラニュリンはマウスのカルグラニュリンAのみであり、ヒトを含む他の温血動物に普遍的な生理機能ではない。カルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの抗菌活性はカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBが菌の生育に必要な溶液中の2価金属をトラップするためと考えられ、カルグラニュリンに特異的な生理機能とは考えにくい。

【0009】

カルグラニューリンAおよびカルグラニューリンBの生理的な機能はほとんどわかっていないのが現状であり、カルグラニューリンAおよびカルグラニューリンBが好中球または単球の顆粒放出機構をコントロールする事は全く知られていない。カルグラニューリンCは1997年にJ. D. Gottschらによりクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている(Gottsch, J. D. ら, Trans. Am. Ophthalmol. Soc. (1997) 95:111-125)。カルグラニューリンCは顆粒球に含まれることが知られているが、他の細胞での局在は不明である。またその機能も不明である。よってカルグラニューリンCが好中球または単球の顆粒放出機構をコントロールする事は全く知られていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、顆粒放出能を有する細胞系の顆粒放出をコントロールさせる方法およびそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する薬剤のスクリーニング法を提供することを目的とするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、顆粒放出能を有する細胞系に、カルグラニューリン活性を増加または減少せしめる処理をなし、次いで顆粒放出を増加または減少せしめることを特徴とする顆粒放出のコントロール方法、a) 顆粒放出能を有する細胞系を薬剤にて処理し、高透過性細胞膜を有する当該細胞系を調整する；

b) 高透過性細胞膜を有する当該細胞系に各種濃度のカルグラニューリンおよび水可溶性カルシウムを添加し、温度湿度制御室内で適当な時間インキュベートする；

ついで

c) 放出された物質量を定量評価する；

ことを特徴とする当該細胞系からの顆粒放出反応をコントロールするために細胞

内カルグラニユリン活性を変化させ顆粒放出反応を定量する方法、およびスクリーニングの対象となる物質を、上記の定量系に存在させ、顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質のスクリーニング方法を見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0012】

ここで顆粒放出能を有する細胞系とは温血動物由来の好中球（中好性白血球、中性好性白血球、異好性白血球または多形核白血球とも呼ばれる）およびHL 60細胞など顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株である。好中球は温血動物の血液もしくはカゼイン腹腔内投与などの刺激により腹腔内に移行してくる細胞から分離調整される（続生化学実験講座8血液・下、第679-685頁）。顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株は適当な分化誘導剤にて好中球様細胞に分化誘導をし使用する（続生化学実験講座8血液・上、第117-123頁）。

【0013】

高透過性細胞膜を有する好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株は界面活性剤、例えばジギトニン、サポニン、Octylphenol-polyethyleneglycolether（トリトンX-100）、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate（CHAPS）またはpolyoxyethylene(20)cetyletcher（Brij 58）など、菌体由来毒素、例えばalpha-トキシン、ストレプトリジン-0など、またはグリセリンなど細胞膜の一部に作用し、膜に穴をあける作用を有する薬剤にて、例えば、細胞 1×10^7 個/ml 当たり $0.01 \mu\text{M} \sim 1000 \text{mM}$ にて5~120分間、 $4^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ にて処理する事により得られる。このほかの高透過性細胞膜を有する好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株を調整する適当な方法として、細胞を短い電気パルス（エレクトロポレーション法）により、細胞 1×10^7 個/ml 当たり $1 \sim 10 \text{KV/cm}$ にて1~30分間、 $4^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ にて処理し、細胞膜の透過性を増加せしめることを含む。

【0014】

カルグラニユリンとは温血動物に存在する、カルグラニユリンA（S100A

8、MRP8、p8または、L1軽鎖等命名されている) またはカルグラニュリンB (S100A9、MRP14、p14または、L1重鎖等命名されている) またはそれらの同属体である。ヒト型のカルグラニュリンAおよびヒト型のカルグラニュリンBはクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている (E. Lagasse and R. G. Clerc, Mol. Cellular Biol. (1988) 8:2402-2410)。またマウス型のカルグラニュリンAおよびマウス型のカルグラニュリンBはクローニングされ、その全アミノ酸配列が報告されている (E. Lagasse and I. L. Weissman, Blood (1992) 79:1907-1915)。マウス型のカルグラニュリンAおよびマウス型のカルグラニュリンBはヒト型のカルグラニュリンAおよびヒト型のカルグラニュリンBに対しそれぞれ約60%と高いアミノ酸配列の相同性を示す。温血動物に存在するカルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBはそれぞれ、動物種差によるアミノ酸配列の違いが比較的少ないと考えられる。

【0015】

本発明におけるカルグラニュリン活性とは、カルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBに基づく活性であれば良く、またこのカルグラニュリン活性は後述する実施例のカルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBの代わりにそれらの同属体を用いて顆粒球の放出能を確認することにより実測できる。

カルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBの同属体とは、カルグラニュリン活性を有するそれらの変異体、断片および誘導体である。変異体とはDNAのレベルにおいて自然にまたは人為的な遺伝子操作、例えば部位特異的突然変異誘発により形成される同様活性を有する一部アミノ酸の置換、欠失または付加 (PNAS, 75, pp4268-4270 (1978)、Necl. Acid. Res., 6, pp2973-2985 (1979)、Genetic Engineering-Principle and Methods-Vol. 3, pp1-32 (1981) 等) されたカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBである。断片とは連続するアミノ酸を含んでなるカルグラニュリンAおよびカルグラニュリンBの断片である。

【0016】

誘導体とは例えば、官能基、例えばアミノ、ヒドロキシ、メルカプト又はカルボキシ基が誘導体化、例えばグルコシル化、アシル化、アミド化又はエステル化されているものである。誘導体とはカルグラニュリンAまたはカルグラニュリンBの二量体、その変異体またはその断片であって、システイン残基のメルカプト基が酸化された形態ジスフィルド形であって分子間S-S結合を提供しているもの、ならびに、カルグラニュリンAまたはその変異体もしくはその断片とカルグラニュリンBまたは変異体もしくはその断片との混合二量体であってシステイン残基の酸化されたメルカプト基を介して結合しているものであって、カルグラニュリン活性を有するものであればなんら限定されない。

【0017】

本発明によれば、顆粒放出能を有する細胞系、好ましくは好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に、カルグラニュリン活性を増加せしめ、ついで顆粒放出を増加せしめる方法として、高透過性細胞膜を有する好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に、カルシウムイオン存在下で活性化させたカルグラニュリンを各種濃度で添加し、その添加したカルグラニュリン濃度に応じた顆粒放出を起こさせる方法が提供される。

【0018】

好中球に含まれる顆粒としては、アズール顆粒（一次顆粒）、特殊顆粒（二次顆粒）および貯蔵顆粒（三次顆粒）が挙げられる。アズール顆粒からは酸性beta-グリセロフォスファターゼ、beta-グルクロニダーゼ、N-アセチル-beta-グルクロサミニダーゼ、alpha-マンノシダーゼ、アリースルファターゼ、beta-ガラクトシダーゼ、alpha-フコシダーゼ、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンG、エラスターゼ、プロテイナーゼ3、ミエロペルオキシダーゼ、およびリゾチームなどが放出される。特殊顆粒からはコラゲナーゼ、リゾチーム、ラクトフェリン、ビタミンB12結合蛋白質およびシトクロムbなどが放出される。貯蔵顆粒からはゲラチナーゼ、N-アセチル-beta-グルクロサミニダーゼ、カテプシンB、カテプシンD、beta-グルクロニダーゼ、beta-グリセロフォスファターゼおよびalpha-マンノ

シダーゼなどが放出される。放出された物質の量はそれぞれ適当な方法にて定量する。

【0019】

例えば、アズール顆粒より放出されるミエロペルオキシダーゼ量は3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を基質とし、分光光度計にて650nmでの吸光度の増加率より定量する。特殊顆粒より放出されるラクトフェリンは抗ラクトフェリン抗体を使用したELISA (enzyme-linked immunoassay) により定量する。貯蔵顆粒より放出されるN-アセチル-beta-グルクロサミニダーゼ、beta-グルクロニダーゼ、およびalpha-マンノシダーゼは4-メチルウンベリフェリル誘導体を基質とし、加水分解され遊離した4-メチルウンベリフェリルを蛍光分光光度計にて励起波長365nm、蛍光波長450nmにて定量する。

【0020】

調整した高透過性細胞膜を有する好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に適当な濃度のカルシウム溶液と適当な濃度のカルグラニユリンを添加し顆粒放出量を測定する。例えば、ヒト好中球をジギトニンにて処理し高透過性細胞膜を有するヒト好中球を 5×10^6 個/ml $\sim 5 \times 10^7$ 個/mlに調整し、カルグラニユリンAを0.01 $\sim 10 \mu\text{M}$ 、好ましくは0.1 $\sim 3 \mu\text{M}$ 、塩化カルシウムを0.01 $\sim 10 \mu\text{M}$ 、好ましくは0.1 $\sim 3 \mu\text{M}$ となるように添加し、温度湿度制御室内で25 $\sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは30 $\sim 37^\circ\text{C}$ で、1 ~ 60 分間、好ましくは5 ~ 15 分間インキュベートする。

【0021】

また、このインキュベートにおいて用いられる媒体としては、例えば100mM ~ 200 mMのKCl、10mM ~ 20 mMのNaClおよび0.3mM ~ 3 mMのEGTAを含むリン酸、MOPS、HEPES、Tris、TAPA、BESまたはTESなどのpH7 ~ 7.4 程度の緩衝液が挙げられる。

さらにこのインキュベートの間に放出された物質量を定量し、カルグラニユリン非添加のコントロールと比較する。例えばヒト型カルグラニユリンAを0.3、1および3 μM 、カルシウムを1 μM となるように添加し、37 $^\circ\text{C}$ で5分間イ

ンキュベートし、放出されるエラスターゼの量を定量した場合、カルシウムのみを $1\ \mu\text{M}$ となるように添加したコントロールに比較し、顆粒球からのエラスターゼの放出量がカルグラニューリンA添加量が高いカルグラニューリン活性を増加せしめるに従って上昇し、カルグラニューリンAを $3\ \mu\text{M}$ 添加した場合顆粒球からのエラスターゼの放出量が約8倍と劇的に増加する。

【0022】

本発明によれば、好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に、カルグラニューリン活性を減少せしめ、ついで顆粒放出を減少せしめる方法の為に使用する、カルグラニューリン活性阻害剤のスクリーニング法が提供される。適当な濃度のスクリーニングの対象となる物質、例えば $1\sim 100\ \mu\text{M}$ の濃度を選択し、高透過性細胞膜を有する好中球懸濁液または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株懸濁液に存在させ、適当な濃度のカルシウムイオン存在下、例えば $0.01\sim 10\ \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\sim 3\ \mu\text{M}$ で活性化させたカルグラニューリンを適当な濃度、例えばカルグラニューリンAを $0.01\sim 10\ \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\sim 3\ \mu\text{M}$ で添加し、増加した顆粒放出量を減少せしめる物質をスクリーニングする。

【0023】

本発明によれば、好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に、カルグラニューリン活性を増加せしめ、ついで顆粒放出を増加せしめる方法の為に使用する、カルグラニューリン活性活性化剤のスクリーニング法が提供される。適当な濃度のスクリーニングの対象となる物質、例えば $1\sim 100\ \mu\text{M}$ の濃度を選択し、高透過性細胞膜を有する好中球懸濁液または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株懸濁液に存在させ、適当な濃度のカルシウムイオン、例えば $0.01\sim 10\ \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\sim 3\ \mu\text{M}$ 存在下で活性化させたカルグラニューリンを適当な濃度、例えばカルグラニューリンAを $0.01\sim 10\ \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1\sim 3\ \mu\text{M}$ で添加し、増加した顆粒放出量をさらに増加せしめる物質をスクリーニングする。

【0024】

好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株の細胞膜を透過でき得

カルグラニユリン活性活性化剤はより簡便なカリグラニユリン活性阻害剤のスクリーニング方法を提供する。すなわち、適当な濃度のスクリーニングの対象となる物質、例えば $1 \sim 100 \mu\text{M}$ の濃度を選択し、好中球懸濁液または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株懸濁液に存在させ、適当な濃度のカルグラニユリン活性活性化剤、例えば $0.01 \sim 100 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ を添加し、起こる顆粒放出を阻害する物質をスクリーニングする。

【0025】

好中球の顆粒放出は前記のように血管内膜を障害する。血管内膜障害は成人呼吸窮迫症候群 (ARDS)、急性心筋梗塞時の虚血後再灌流障害、糸球体腎症、のう胞性線維症、リウマチ性関節炎、慢性気管支炎、脳血管レン縮、喘息、末梢循環障害、狭心症、高血圧症、動脈硬化に深く関与している。従って、上記好中球顆粒放出阻害剤スクリーニング法は血管内膜障害抑制物質のスクリーニング法としても用いることができる。

【0026】

他の適当な、カルグラニユリン活性を好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に増加せしめる方法はカルグラニユリンの細胞融合を利用した方法、マイクロインジェクション、低張溶液による方法、レーザービームによる方法、エレクトロポレーションによる方法などにより細胞内への導入およびカルグラニユリン遺伝子のリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法などによる細胞内への導入を包含する。

【0027】

他の適当な、カルグラニユリン活性を好中球または顆粒球に分化誘導可能な培養白血病細胞株に減少せしめる方法はカルグラニユリンに対するアンチセンスRNAもしくはアンチセンスDNAを細胞内に取り込ませる方法を包含する。

【0028】

【発明の実施の形態】

次いで、本発明の実施例を挙げて具体的に示すが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

【0029】

【実施例1】

カルグラニユリン含量の増減に基づいてヒト好中球のエラスターゼ放出をコントロールさせる方法

エラスターゼは好中球の1次顆粒内に存在する代表的な放出物質である。エラスターゼは蛋白質分解酵素であり、血管等に存在する弾性蛋白質エラスチンを分解し、障害を発生させる。ヒト好中球を使用し、エラスターゼ放出量をカルグラニユリンにてコントロールする方法について説明する。

【0030】

好中球浮遊液はヒト静脈より採血された血液より続生化学実験講座8血液・下、第679-685頁に記載された方法により調整した。細胞濃度が 1×10^7 個/mlとなるように好中球浮遊液をプラスチック製試験管内でPermeabilized Buffer (PB) 中(30mM HEPES、100mM KCl、20mM NaCl、1mM EGTA、pH7.0)に懸濁し、温度湿度制御室内で37℃の条件で10分間インキュベートした。ジギトニン(Sigma社製)を終濃度5~7.5 μ g/mlとなるように好中球浮遊液に添加し、温度湿度制御室内で37℃の条件で15分間インキュベートした。好中球浮遊液を1200rpmで5分間遠心分離した。上清を捨てた後、沈殿物である好中球をPB中に再浮遊し高透過性好中球浮遊液(細胞濃度; 1×10^7 個/ml)を調整した。

【0031】

高透過性好中球浮遊液を96穴イムノプレートに200 μ lずつ分注し、温度湿度制御室内で37℃の条件で15分間インキュベートした。CaCl₂を終濃度1 μ Mとなるように、カルグラニユリンAもしくはカルグラニユリンBを終濃度0 μ M、0.3 μ M、1 μ Mまたは3 μ Mとしてカルグラニユリン活性が増加するようにそれぞれ96穴イムノプレートに添加し、温度湿度制御室内で37℃の条件で5分間インキュベートした。

【0032】

96穴イムノプレートを4℃の条件下、1200rpmで1分間遠心分離し(イムノプレート用遠心分離器)、上清を別の96穴イムノプレートに160 μ l

ずつ分注し、温度湿度制御室内で37℃の条件で5分間インキュベートした。エラスターゼ基質10mM (Suc-Ala-Pro-Ala-pNA) を96穴イムノプレートに添加し軽く振とうした後、37℃の条件で30分間インキュベーションし、405nmの吸収強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

【0033】

結果：結果は図1（カルグラニユリンAの場合）および図2（カルグラニユリンBの場合）に示される通りであった。カルグラニユリンAはその添加量を増加せしめてカルグラニユリン活性を増加させることにより、好中球のエラスターゼ放出量を増加させた（図1）。カルグラニユリンA非存在下のエラスターゼ放出量を1とした時、3μMのカルグラニユリンAはエラスターゼ放出量を約8倍と顕著に増加させた。カルグラニユリンBはその添加量を増加せしめてカルグラニユリン活性を増加させることにより、好中球のエラスターゼ放出量を増加させた（図2）。カルグラニユリンB非存在下のエラスターゼ放出量を1とした時、3μMのカルグラニユリンBはエラスターゼ放出量を約7倍と顕著に増加させた。

【0034】

この結果は、好中球内のカルグラニユリンAもしくはカルグラニユリンB量を変化させることでエラスターゼの放出量を顕著に変化でき得ることを示す。

【0035】

【実施例2】

カルグラニユリン含量の増減に基づいてヒト好中球のラクトフェリン放出をコントロールさせる方法

ラクトフェリンは好中球の2次顆粒内に存在する代表的な物質である。ヒト好中球を使用し、ラクトフェリン放出量をカルグラニユリンにてコントロールする方法について説明する。

【0036】

好中球浮遊液はヒト静脈より採血された血液より続生化学実験講座8血液・下、第679-685頁に記載された方法により調整した。細胞濃度が 1×10^7 個/mlとなるように好中球浮遊液をプラスチック製試験管内でPBに懸濁し、温度湿度制御室内で37℃の条件で10分間インキュベートした。ジギトニン（

Sigma社製)を終濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように好中球浮遊液に添加し、温度湿度制御室内で 37°C の条件で15分間インキュベートした。

【0037】

好中球浮遊液を 1200rpm で5分間遠心分離した。上清を捨てた後、沈殿物である好中球をPB中に再浮遊し高透過性好中球浮遊液(細胞濃度; 1×10^7 個/ ml)を調整した。高透過性好中球浮遊液を96穴イムノプレートに $200\mu\text{l}$ ずつ分注し、温度湿度制御室内で 37°C の条件で15分間インキュベートした。 CaCl_2 を終濃度 $1\mu\text{M}$ となるように、カルグラニュリンAもしくはカルグラニュリンBを終濃度 $0\mu\text{M}$ 、 $0.3\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ または $3\mu\text{M}$ としてカルグラニュリン活性が増加するようにそれぞれ96穴イムノプレートに添加し、温度湿度制御室内で 37°C の条件で5分間インキュベートした。96穴イムノプレートを 4°C の条件下、 1200rpm で1分間遠心分離し(イムノプレート用遠心分離器)、上清を得た。ラクトフェリンの定量は、ELISA-kit(OXIS社)を用いた。

【0038】

結果：結果は図3および図4に示される通りであった。カルグラニュリンAはその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のラクトフェリン放出量を増加させた(図3)。カルグラニュリンA非存在下のラクトフェリン放出量を1とした時、 $3\mu\text{M}$ のカルグラニュリンAはラクトフェリン放出量を約6倍と顕著に増加させた。カルグラニュリンBはその添加量を増加せしめてカルグラニュリン活性を増加させることにより、好中球のラクトフェリン放出量を増加させた(図4)。カルグラニュリンB非存在下のラクトフェリン放出量を1とした時、 $3\mu\text{M}$ のカルグラニュリンBはラクトフェリン放出量を約5倍と顕著に増加させた。

【0039】

この結果は、好中球内のカルグラニュリンAもしくはカルグラニュリンB量を変化させることでラクトフェリンの放出量を顕著に変化でき得ることを示す。実施例1、2の結果より、カルグラニュリンが好中球の顆粒放出をコントロールする重要な蛋白質であることが示唆される。

【0040】

【実施例3】

スクリーニングの対象となる物質を、カルグラニユリン活性を変化させ好中球からのエラスターゼ放出反応量を顕著に増加させた系に存在させ、顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する物質のスクリーニング法。

ヒト静脈より採血された血液より、続生化学実験講座8血液・下、第679-685頁に記載された方法により調整した。細胞濃度が 1×10^7 個/mlとなるように好中球浮遊液をプラスチック製試験管内でPB中に懸濁し好中球懸濁液（細胞濃度； 1×10^7 個/ml）を調整し、温度湿度制御室内で37℃の条件で10分間インキュベートした。ジギトニンを終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ となるように好中球懸濁液に添加し、温度湿度制御室内で37℃の条件で15分間インキュベートした。好中球懸濁液を1200rpmで5分間遠心分離した。

【0041】

上清を捨てた後、好中球をPB中に再懸濁し高透過性好中球懸濁液（細胞濃度； 1×10^7 個/ml）を調整した。高透過性好中球懸濁液を96穴イムノプレートに分注し、温度湿度制御室内で37℃の条件で5分間インキュベートした。

スクリーニングの対象となる物質を、終濃度 $30 \mu\text{M}$ となるように添加し温度湿度制御室内で37℃の条件で15分間インキュベートした。

【0042】

CaCl_2 を終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように、カルグラニユリンAを終濃度 $3 \mu\text{M}$ となるようにそれぞれ96穴イムノプレートに添加し、温度湿度制御室内で37℃の条件で5分間インキュベートした。96穴イムノプレートを4℃の条件下、1200rpmで1分間遠心分離し（イムノプレート用遠心分離器）、上清を別の96穴イムノプレートに分注し、温度湿度制御室内で37℃の条件で5分間インキュベートした。エラスターゼ基質 10mM （ $\text{Suc-Ala-Pro-Ala-pNA}$ ）を96穴イムノプレートに添加し軽く振とうした後、37℃の条件で30分間インキュベーションし、405nmの吸収強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

【0043】

結果：結果は表 1 に示される通りであった。スクリーニングの対象となる被験物質を含まないコントロールの放出量を 100% とし、それと比較することによりスクリーニングの対象となる被験物質の放出阻害率を求めた。化合物 1 および化合物 2 は、カルグラニユリン A の活性を増加させて、好中球からのエラスターゼ放出反応量を顕著に増加させた系において、顕著に放出量を抑制した。化合物 3 は上記系において顕著に放出量を増加させた。

【0044】

【表 1】

被験化合物名	放出阻害率 (%)
コントロール	100
化合物 1	61
化合物 2	51
化合物 3	151

化合物 1：N-（4-メトキシベンジル）-N-（4-メトキシフェニル）
-7-ピペラジニルヘプチルアミン 3 塩酸塩
化合物 2：N-ベンジル-N-（4-メトキシフェニル）
-7-ピペラジニルヘプチルアミン 3 塩酸塩
化合物 3：1、1-（ジ-4-ヒドロキシフェニル）-2-エチル-1
-オクタエン

【0045】

【発明の効果】

本発明の方法は、好中球の顆粒放出をコントロールする方法としてきわめて有用であり、またそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する薬剤のスクリーニング法は好中球の顆粒放出により惹起される血管内膜障害に基づく各種病態の治療薬を提供する上できわめて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

カルグラニユリン A によるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のエラスターゼ放出反応図である。

【図 2】

カルグラニユリン B によるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のエラスターゼ

放出反応図である。

【図 3】

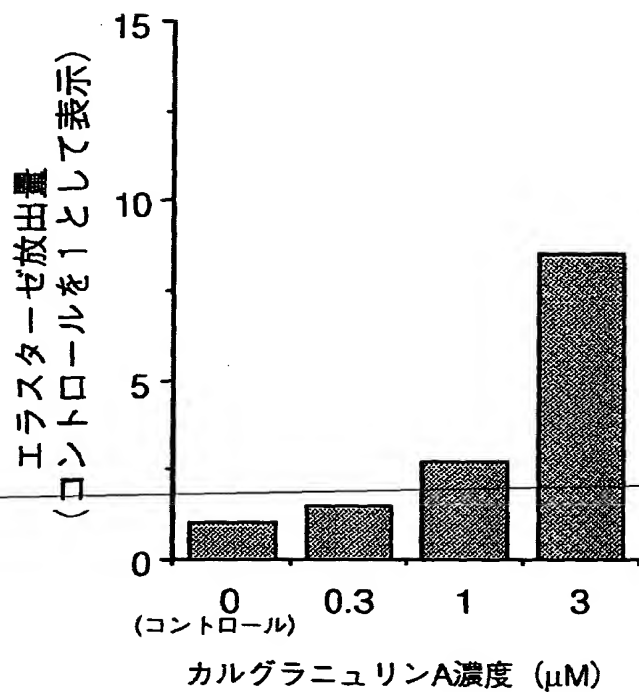
カルグラニユリン A によるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のラクトフェリン放出反応図である。

【図 4】

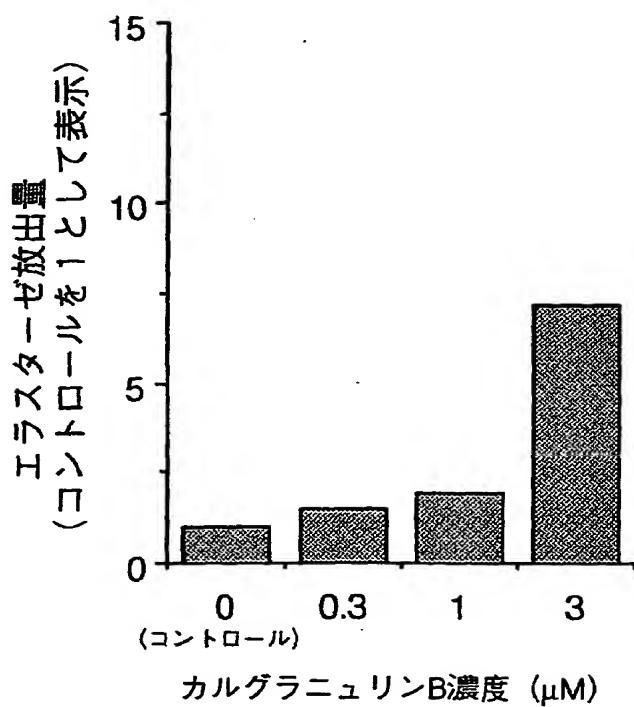
カルグラニユリン B によるヒト高透過性細胞膜を有する好中球のラクトフェリン放出反応図である。

【書類名】 図面

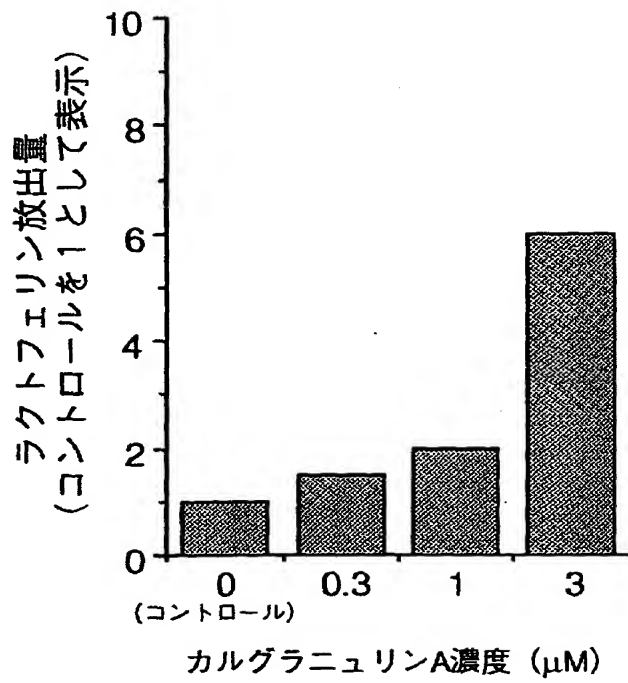
【図1】



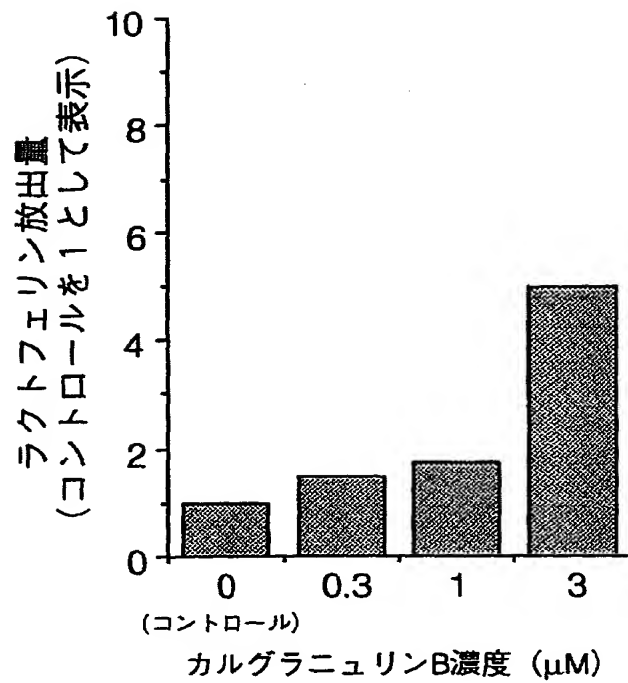
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 顆粒放出のコントロール方法

【解決手段】 顆粒放出能を有する細胞系に、カルグレニューリン活性を増加または減少せしめる処理をなし、次いで顆粒放出を増加または減少せしめることを特徴とする顆粒放出のコントロール方法およびそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する薬剤のスクリーニング方法。

【効果】 好中球の顆粒放出をコントロールする方法としてきわめて有用であり、またそれに基づいた顆粒放出反応を阻害もしくは活性化する薬剤のスクリーニング法は好中球の顆粒放出により惹起される血管内膜障害に基づく各種病態の治療薬を提供する上できわめて有用である。

【選択図】 選択図なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】
【住所又は居所】
【氏名又は名称】

申請人
000000033
大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
旭化成工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000033]

1. 変更年月日	1990年 8月16日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
氏 名	旭化成工業株式会社

Patent Application No.274574/1998

【Document Name】 Patent Application

【File Number】 X10-01096

【Filing Date】 29 September, 1998

【Address】 Commissioner of Patent Office

【International Patent Classification】

C12Q 3/00

C12Q 1/00

【Title of the Invention】

METHOD OF CONTROLLING SECRETION OF
GRANULES

【Number of claims】 6

【Inventor】

【Address or Residence】

c/o Asahi Kasei Kogyo Kabushikikaisha 2-
banchi-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka-
ken

【Name】 Minoru SETO

【Inventor】

【Address or Residence】

c/o Asahi Kasei Kogyo Kabushikikaisha 2-
banchi-1, Samejima, Fuji-shi, Shizuoka-
ken

【Name】 Kouichirou FUKUDA

【Applicant】

【Code Number】 000000033

【Name】 Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha

【Representative】 Kazumoto YAMAMOTO

[Charge]

[Deposit Number]	011187
[Amount of Payment]	¥21,000

[List of Submission]

[Name of Submission]	Specification	1
[Name of Submission]	Drawing	1
[Name of Submission]	Abstract	1

[Proof]	Yes
----------------	-----

【Document Name】

Specification

【Title of the Invention】

METHOD OF CONTROLLING SECRETION
OF GRANULES

【Claims】

【Claim 1】

A method of controlling granule secretion comprising performing a treatment to increase or decrease an activity of calgranulin on a cell line having granules secretion capability, thereby increasing or decreasing granule secretion from the cell line.

【Claim 2】

The method according to claim 1, wherein the cell line having granule secretion capability is neutrophils or neutrophil-like cultured cells originating from a warm-blooded animal.

【Claim 3】

The method according to claim 1, wherein the calgranulin is calgranulin A, calgranulin B or homologue thereof.

【Claim 4】

A method of determining a granule secreting reaction by changing an activity of calgranulin in cell line in order to control the granule secreting reaction in the cell, comprising;

a) treating the cell line having granules secretion capability with drug to prepare the cell line having a permeabilized cell membranes;

b) adding various concentration of calgranulins and water-soluble calcium to the cell line having a permeabilized

cell membranes, and incubating the cell line in a incubator controlling temperature and humidity for a proper period; and
c) determining the amount of substance secreted.

【Claim 5】

The method according to claim 4, wherein the cell line having granule secretion capability is neutrophils or neutrophil-like cultured cells originating from a warm-blooded animal.

【Claim 6】

A method of screening substances which inhibit or activate a granule secreting reaction, comprising existing the substances to be screened in a determining system of the method described in claim 4.

【Detailed Description of the Invention】

【0001】

【Technical Field where the Invention Belongs】

The present invention relates to a method of controlling secretion of granules from cell lines having granule secretion capability, preferably secretion of granules from neutrophils and to a method of screening drugs which inhibit or activate a granule secreting reaction based on the method of controlling secretion of granules.

【0002】

【Background Art】

Neutrophils play an important role in the control of a living body. A major function of neutrophils is to migrate against bacteria and microorganisms which invade into living bodies to eat the bacteria and microorganisms, thereby

rendering a sterilizing effect. In one sterilization mechanism of neutrophils, sterilization is effected after fusion of phagosomes and granules by the action of bactericidal proteins and proteases which are present in the granules. Although bactericidal proteins and proteases which are present in neutrophils are important sterilization substances, their excessive production and secretion are known to intimal injure of blood vessels (Fahey, T. J. et al., In Update Pulmonary Diseases and Disorders (Fishman AP, ed) (1992) McGraw-Hill, New York).

【0003】

Intimal injury of blood vessels is deeply concerned with adult respiratory distress syndrome (ARDS) (Weiland, J. E. et al., Am. Rev. Respir. Dis. (1986) 133: 218-225), injury by reperfusion after ischemia (Cavanagh, S. P. et al. Cardiovasc. Surg. (1998) 6: 112-118), glomerular nephritis (Jennette, J. C. and Falk, R. J., Am. J. Kidney Dis. (1994) 24: 130-141), cystic fibrosis (Greenberger, P. A., J. A. M. A (1997) 278: 1924-1930), rheumatoid arthritis (Chang, D. J. et al. Semin. Arthritis Rheum. (1996) 25: 390-403), chronic bronchitis (Hoidal, J. R., Semin. Respir. Infect. (1994) 9: 8-12), spasm of blood vessel (Merhi, Y. et al. Arterioscler. Thromb. (1993) 13: 951-957), asthma (Borson, D. B. et al. Am. J. Physiol. (1991) 260: L212-L225), peripheral circulation disorder and angina pectoris (Merhi, Y. et al. Arterioscler. Thromb. (1993) 13: 951-957), hypertension (Dzau, V. J., Am. J. Med. (1984) 77: 31-36), arteriosclerosis (Belch, J. J., Curr. Opin. Lipidol. (1994) 5: 440-446). Therefore, the substances which inhibit

secretion of neutrophil granules are thought to be useful as a therapeutic drug for treating diseases associated with secretion of neutrophil granules.

【0004】

However, the mechanism of secretion of neutrophil granules is not yet elucidated at present. An increase in the calcium concentration in neutrophils is known to be inevitable for secretion of granules. However, no molecules which are activated by an increase in the calcium concentration and induce granule secretion are known. Therefore, there have been no specific neutrophil secretion inhibitors practically developed so far.

【0005】

The study for specifying intra neutrophil molecules which are activated by the increase in the calcium concentration and researching compounds which inhibit such molecules are expected to contribute to the development of an effective preventive and/or treating agent for diseases or conditions associated with secretion of neutrophil granules, for example, adult respiratory distress syndrome (ARDS), injury by reperfusion after ischemia during acute myocardial infarction, glomerular nephritis, cystic fibrosis, rheumatoid arthritis, chronic bronchitis, cerebral vasospasm, asthma, peripheral circulation disorder, angina pectoris, hypertension, and arteriosclerosis.

【0006】

There are three types of calgranulins: calgranulin A (Burmeister, G., Immunology (1986) 171: 461-474) (named as

S100A8, MRP8, p8, or L1 light chain), calgranulin B (Burmeister, G., Immunology (1986) 171: 461-474) (named as S100A9, MRP14, p14 or L1 heavy chain), and calgranulin C (Dell'Angelica, E. C., J. Biol. Chem. (1994) 269: 28929-28936) (named as S100A12 or p6).

【0007】

Calgranulin A is a calcium-binding protein with a molecular weight of about 8 kD, calgranulin B is a calcium-binding protein with a molecular weight of about 14 kD, and calgranulin C is a calcium-binding protein with a molecular weight of about 10 kD and they are classified in the S100 protein.

Calgranulin A and calgranulin B were cloned by E. Lagasse et al. and their whole amino acid sequences were reported in 1988 (E. Lagasse and R. G. Clerc, Mol. Cellular. Biol. (1988) 8, 2402-2410). Calgranulin A and calgranulin B are present specifically in neutrophils and monocytes and occupy about 5% of all proteins in neutrophils or monocytes.

【0008】

As a finding suggesting intracellular physiological functions of calgranulins, the action of calgranulin A and calgranulin B inhibiting the activity of casein kinases I and II has been reported (Murao S. et al. J. Biol. Chem (1989) 264: 8356-8360).

However, physiological functions of casein kinases I and II in neutrophils and monocytes are not yet clarified at present. As the findings suggesting extracellular physiological functions of calgranulins, the function of

calgranulin A to increase migration of neutrophils and monocytes (Geczy, C. L., Biochim. Biophys. Acta (1996) 1313: 246-253) and the antibacterial activity of calgranulin A and calgranulin B (Murthy, A. R. K. et al., J. Immunol. (1993) 151: 6291-6301) have been reported.

However, the only calgranulin which exhibits neutrophil/monocyte migration activity is mouse calgranulin A. Thus, this is not a physiological activity common to other warm-blooded animals including human. The antibacterial activity of calgranulin A and calgranulin B is due to their capability of trapping divalent metals in a solution essential for the growth of bacteria. The activity would not be a physiological function specific to calgranulins.

[0009]

Only little is known about physiological functions of calgranulin A and calgranulin B at the present time. The action of calgranulin A and calgranulin B to control secretion of neutrophil or monocyte granules has not been known at all. Calgranulin C was cloned by J. D. Gottsch et al. and its whole amino acid sequence was reported in 1997 (Gottsch, J. D. et al., Trans. Am. Ophthalmol. Soc. (1997) 95: 111-125). Calgranulin C is known to be present in granulocytes, but whether calgranulin C is present in other cells is not known. Neither, is its function known. Thus, the effect of calgranulin C on the control of the mechanism of neutrophil or monocyte granule secretion has not been known.

[0010]

[Problems to be Solved by the Invention]

An object of the present invention is to provide a method of controlling secretion of granules of cell lines having granule secretion capability, and a method of screening drugs which inhibit or activate the granule secreting reaction based on the method of controlling secretion of granules.

[0011]

[Means to Solve the Problems]

As a result of extensive studies to solve the above problems, the inventors of the present invention have found following methods:

a method for controlling granule secretion comprising performing a treatment to increase or decrease an activity of calgranulin on a cell line having granules secretion capability, thereby increasing or decreasing granule secretion from the cell line;

a method for determining a granule secreting reaction by changing an activity of calgranulin in cell line in order to control the granule secreting reaction in the cell, comprising;

a) treating the cell line having granules secretion capability with drug to prepare the cell line having a permeabilized cell membranes;

b) adding various concentration of calgranulins and water-soluble calcium to the cell line having a permeabilized cell membranes, and incubating the cell line in a incubator controlling temperature and humidity for a proper period; and

c) determining the amount of substance secreted; and

a method for screening substances which inhibit or

activate a granule secreting reaction, comprising being the substances to be screened in a determining system of the determining method described above. Those findings have led to the completion of the present invention.

[0012]

The cell line having granule secretion capability used herein is neutrophils (called neutrophilous leukocytes, neutrophilic leukocytes, heterophilic leukocytes, or polymorphonuclear leucocytes) originating from warm-blooded animals or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes such as HL60 cells. Neutrophils can be separated from blood of the warm-blooded animals or cells which move into the abdominal cavity by stimulation such as intraperitoneal administration of casein (Biological Chemistry Experiment Lecture, second series, No. 8 Blood, Vol. 2, 679-685). Cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes are used after induction of differentiation into neutrophil-like cells by using a suitable inductor of differentiation (Biological Chemistry Experiment Lecture, second series, No. 8 Blood, Vol. 1, 117-123).

[0013]

Neutrophils having permeabilized cell membranes or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes can be obtained by treating the cells with an agent having a function of making holes through the membranes by acting on part of the cell membranes, for example, a surfactant such as digitonin, saponin, octylphenol-



10

polyethyleneglycolether (Triton X-100), 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammoniol]-1-propane-sulfonate (CHAPS), polyoxyethylene (20) cetylether (Brij 58), bacterial toxins such as α -toxin, streptolysin-O, or glycerol, after addition of an amount of 0.01 μ M to 1000 mM per 1×10^7 cells/ml at 4-40°C for 5-120 minutes Treatment of cells using short electric pulses (an electroporation method) to prepare neutrophils having permeabilized cell membranes or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes is another preferable method of forming permeabilized cell membranes. Specifically, an amount of 1×10^7 cells/ml of cell line is treated with 1-10 KV electric pulses at 4-40°C for 1-30 minutes.

【0014】

Calgranulins are calgranulin A (named as S100A8, MRP8, p8, or L1 light chain), calgranulin B (named as S100A9, MRP14, p14 or L1 heavy chain) or homologues thereof, those are present in warm-blooded animals. Human-type calgranulin A and human-type calgranulin B were cloned and their whole amino acid sequences have been reported (E. Lagasse and R. G. Clerc, Molc. Cellular. Biol. (1988) No. 8, 2402-2410). Mouse-type calgranulin A and mouse-type calgranulin B were cloned and their whole amino acid sequences have been reported (E. Lagasse and I. L. Weissman, Blood (1992) 79: 1907-1915). Mouse-type calgranulin A and mouse-type calgranulin B show about 60% of a high homology of amino acid sequence to those of human-type calgranulin A and human-type calgranulin B, respectively. Calgranulin A and calgranulin B which are present in various warm-blooded animals are thought to exhibit comparatively



11/11/11

small difference in the amino acid sequence among animals.

[0015]

In the present invention, a calgranulin activity may be any activity based on calgranulin A or calgranulin B, and this calgranulin activity can be measured by confirming granulocyte secretion capability by using homologue of calgranulin A or calgranulin B in stead of calgranulin A or calgranulin B in the Example described below.

Homologues of calgranulin A or calgranulin B are mutants, fragments, and derivatives of the calgranulins possessing calgranulin activity. The mutants indicate calgranulins exhibiting the same activity as the calgranulin A or calgranulin B, formed by a natural or artificial gene manipulation technique on a DNA level, for example, by the site specific mutagenesis, in which a part of amino acids is replaced, deleted, or added (PNAS, 75, pp4268-4270 (1978), Necl. Acid. Res., 6, pp2973-2985 (1979), Genetic Engineering Principle and Methods, Vol. 3, pp1-32 (1981), etc.). The fragments mean fragments of calgranulin A or calgranulin B which contains continuous amino acids.

[0016]

The derivatives mean calgranulin A or calgranulin B in which the functional group such as an amino group, hydroxyl group, mercapto group, or carboxyl group is modified by, for example, glycosylation, acylation, amidation or esterification. The derivatives further include dimers of calgranulin A or calgranulin B, their mutants or fragments in which the mercapto group of cysteine residue is oxidized to the



11

disulfide form providing intermolecular S-S linkages, as well as mixed dimers produced from calgranulin A, its mutant, or fragment and calgranulin B, its mutant, or fragment which are bound through an oxidized mercapto group of cysteine residue. The derivatives are not limited at all as long as those exhibit the calgranulin activity.

【0017】

According to the present invention, a method of secreting granule corresponding to a concentration of calgranulins added to the permeabilized neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes, when the calgranulins activated in the existence of calcium ion are added in various concentration, as a method of increasing calgranulin activity and a secretion of granulocytes in a cell strains, preferably neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes, can be provided.

【0018】

Azurophil granules (primary granules), specific granules (secondary granules), and storage granules (tertiary granules) are given as granules contained in neutrophils. Acidic β - glycerophosphatase, β - glucuronidase, N-acetyl- β - glucucosaminidase, α - mannosidase, arylsulfatase, β - galactosidase, α - fucosidase, cathepsin B, cathepsin D, cathepsin G, elastase, proteinase 3, myeloperoxidase, lysozyme, and the like are secreted from azurophil granules. Collagenase, lysozyme, lactoferrin, vitamin B₁₂-binding protein, cytochrome b, and the like are secreted from the special granules.

Gelatinase, N-acetyl- β -glucosaminidase, cathepsin B, cathepsin D, β -glucuronidase, β -glycerophosphatase, α -mannosidase, and the like are secreted from storage granules. Each of the secreted substances can be quantitatively analyzed by means of an appropriate method.

【0019】

For example, the quantity of myeloperoxidase secreted from Azurophil granules can be determined from the rate of increase in the absorbance at 650 nm by a spectrophotometer using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and a hydrogen peroxide as substrates. Lactoferrin secreted from specific granules can be determined by ELISA (enzyme-linked immunoassay) using an antilactoferrin antibody. The quantity of N-acetyl- β -glucosaminidase, β -glucuronidase, and α -mannosidase secreted from storage granules can be determined by measuring 4-methylumbelliferol which is produced by the hydrolysis of a 4-methylumbelliferol derivative as a substrate using fluorescence spectrophotometer at an excitation wavelength of 365 nm and a fluorescence wavelength 450 nm.

【0020】

The amount of secreted granules is measured, after a calgranulin and a calcium solution are added to the permeabilized neutrophils prepared or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes, to make an appropriate concentration, respectively. For example, 5×10^6 cells/ml to 5×10^7 cells/ml of human neutrophils which are treated with digitonin to make the membrane permeabilized membranes is prepared to 5×10^6 cells/ml to 5×10^7 cells/ml in



1 1

1 1 1 1 1 1

1 1



1

concentration, followed by the addition of 0.01-10 μM , preferably 0.1-3 μM of calgranulin A and 0.01-10 μM , preferably 0.1-3 μM of calcium chloride. The mixture is incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 25-40°C, preferably 30-70°C, for 1-60 minutes, preferably for 5-15 minutes.

[0021]

As examples of the medium used in this incubation buffer solution having pH 7-7.4 comprising phosphoric acid, MOPS, HEPES, Tris, TAPA, BES or TES containing 100 mM - 200 mM potassium chloride, 10 mM - 20 mM sodium chloride and 0.3 mM - 3 mM EGTA can be given.

The amount of the substance secreted during the incubation is determined and compared with a control to which calgranulin is not added. For example, human-type calgranulin and calcium are added to the concentration of 0.3, 1 or 3 μM and 1 μM , respectively, and the resulting mixtures are incubated at 37°C for 5 minutes, then the amount of elastase secretion of above each case is measured. Thereafter, the secretion amounts are compared with that of control which calcium alone is added to the concentration of 1 μM . The secretion amount from elastase rises in accordance with the increase of calgranulin activity depending to the amount of calgranulin A added. The amount of elastase secretion that 3 μM of calgranulin A is added is remarkably increased to about 8 times.

[0022]

According to the present invention a method of screening



2

1

2

3

4

calgranulin activity activators, which is used for increasing calgranulin activity of neutrophils or cultured leukemia cells which can be differentiated into granulocytes and increasing granule secretion, can be provided. Specifically, a substance which is an object of the screening and has an appropriate concentration, for example 1-100 μM , is selected and caused to be present in a suspension of neutrophils having permeabilized cell membranes or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes. Under an appropriate calcium ion concentration, for example, 0.01-10 μM , preferably 0.1-3 μM , a calgranulin activated, for example calgranulin A, are added to the suspension to become an appropriate concentration of calgranulin, for example, 0.01-10 μM , preferably 0.1-3 μM , thereby screening the substance which increases the quantity of increased granules secretion.

【0023】

According to the present invention a method of screening calgranulin activity activators, which is used for decreasing calgranulin activity of neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes and decreasing granule secretion, can be provided. Specifically, a substance which is an object of the screening and has an appropriate concentration, for example 1-100 μM , is selected and caused to be present in a suspension of neutrophils having permeabilized cell membranes or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes. Under an appropriate calcium ion concentration, for example, 0.01-10 μM , preferably 0.1-3 μM , a calgranulin activated, for example

calgranulin A, are added to the suspension to become an appropriate concentration of calgranulin, for example, 0.01-10 μM , preferably 0.1-3 μM , thereby screening the substance which decreases the quantity of increased granules secretion.

【0024】

A simple method of screening a calgranulin activity deactivator can be provided by the calgranulin activity activator permeable through cell membranes of neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes. Specifically, a substance which is an object of screening is selected and caused to be present in a suspension of neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes at an appropriate concentration of the substance, for example, 1-100 μM . A calgranulin activity activator at an appropriate concentration, for example, 0.01-100 μM , preferably 0.1-10 μM , is added to the suspension, thereby screening the substance which inhibits granules secretion.

【0025】

Granule secretion of neutrophils injures intima of blood vessels as mentioned above. Intimal injury of blood vessel intima is deeply associated with adult respiratory distress syndrome (ARDS); injury by reperfusion after ischemia during acute myocardial infarction, glomerular nephritis, cystic fibrosis, rheumatoid arthritis, chronic bronchitis, cerebral vasospasm, asthma, peripheral circulation disorder, angina pectoris, hypertension, arteriosclerosis, and the like. Therefore, the above method of screening the neutrophil



17

17

17

17

17

17

17

17

17

17

granule secretion inhibitor can be applied to the screening of a substance which inhibits the intimal injury of blood vessels.

【0026】

Another preferable method of increasing calgranulin activity in neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes after induction may contain induction into cell such as a method using cell fusion of calgranulin, a microinjection, a method of using a hypotonic solution, a method of using laser beams, an electroporation method, and induction into cell such as a calcium phosphate method using calgranulin gene, a DEAE dextran method, an electroporation method.

【0027】

Furthermore, another preferable method of decreasing calgranulin activity in neutrophils or cultured leukemia cell strains which can be differentiated into granulocytes may contain a method of taking anti-sense RNA or anti-sense DNA to calgranulin into cells.

【0028】

【Embodiments of the Invention】

The present invention will now be described more specifically by way of examples. However, the present invention is not limited to these following examples.

【0029】

【Example 1】

<Method of controlling elastase secretion of human neutrophils according to increasing or decreasing calgranulin content>

Elastase is a typical secretion substance which is

present in primary granules of neutrophils. Elastase is a proteinase which decomposes elastin, an elastic protein present in blood vessels and causes hindrance to occur. A method of controlling elastase secretion by calgranulin using human neutrophils will be described.

【0030】

A neutrophil suspension was prepared from blood collected from human vein according to the method described in Biological Chemistry Experiment Lecture, second series, 8, Blood, the last volume, page 679-685. The neutrophil suspension was adjusted to a concentration of 1×10^7 cells/ml in a plastic test tube using a permeabilized buffer (PB) (30 mM HEPES, 100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 7.0) and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 10 minutes. Digitonin (Sigma company) was added to the neutrophil suspension to a final concentration of 5-7.5 $\mu\text{g/ml}$ and the mixture was incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 15 minutes. The neutrophil suspension was centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. After discarding supernatant, precipitated neutrophils were re-suspended in PB to prepare a permeabilized neutrophil suspension (cell concentration: 1×10^7 cells/ml).

【0031】

The permeabilized neutrophil suspension was distributed to a 96-well immunoplate, 200 μl per well, and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 15 minutes. CaCl_2 and calgranulin A or calgranulin B were added to the well of the 96-well immunoplate to final concentrations of

1 μM (CaCl_2) and 0 μM , 0.3 μM , 1 μM , or 3 μM (calgranulin), respectively, and the resulting mixture was incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 5 minutes.

【0032】

The 96-well immunoplate was centrifuged at 1200 rpm for one minute at 4°C (using a centrifuge for immunoplate). The supernatant is distributed to another 96-well immunoplate, 160 μl per well, and incubated at 37°C for 5 minutes. 10 mM of an elastase substrate (Suc-Ala-Pro-Ala-pNA) was added to the 96-well immunoplate. After gently shaking, the mixture was incubated at 37°C for 30 minutes. Then, absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader.

【0033】

Results: The results are shown in Figure 1 and Figure 2. Calgranulin A increased elastase secretion of neutrophils when the amount of addition is increased so as to increase the calgranulin activity (Figure 1). Assuming that the amount of elastase secretion in the absence of calgranulin A is 1, 3 μM of calgranulin A remarkably increased the amount of elastase secretion to about eight times. Calgranulin B increased elastase secretion of neutrophils when the amount of addition is increased so as to increase the calgranulin activity (Figure 2). Assuming that the amount of elastase secretion in the absence of calgranulin B is 1, 3 μM of calgranulin B remarkably increased the amount of elastase secretion to about seven times.

【0034】

Those results show that change in the amount of calgranulin A or calgranulin B in neutrophils can remarkably change the amount of elastase secretion.

【0035】

【Example 2】

<Method of controlling lactoferrin secretion of human neutrophils according to increasing or decreasing calgranulin content>

Lactoferrin is a typical secretion substance which is present in secondary granules of neutrophils. A method of controlling lactoferrin secretion by calgranulin using human neutrophils will be described.

【0036】

A neutrophil suspension was prepared from blood collected from human vein according to the method described in Biological Chemistry Experiment Lecture, second series, 8, Blood, the last volume, page 679-685). The neutrophil suspension was adjusted to a concentration of 1×10^7 cells/ml using PB in a plastic test tube and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 10 minutes. Digitonin (Sigma company) was added to the neutrophil suspension to a final concentration of 5 µg/ml and the mixture was incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 15 minutes.

【0037】

The neutrophil suspension was centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. After supernatant was discarded, precipitated neutrophils were re-suspended in PB to prepare a permeabilized

neutrophil suspension (cell concentration: 1×10^7 cells/ml). The permeabilized neutrophil suspension was distributed to a 96-well immunoplate, 200 μ l per well, and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 15 minutes. CaCl_2 and calgranulin A or calgranulin B were added to the wells of the 96-well immunoplate to final concentrations of 1 μ M (CaCl_2) and 0 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, or 3 μ M (calgranulin), respectively, and the resulting mixtures were incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 5 minutes. The 96-well immunoplate was centrifuged at 1200 rpm for one minute at 4°C. ELISA-kit (OXIS Co.) was used for the determination of lactoferrin.

【0038】

Results: The results are shown in Figures 3 and 4. Calgranulin A increased lactoferrin secretion of neutrophils when the amount of addition is increased so as to increase the calgranulin activity (Figure 3). Assuming that the amount of lactoferrin secretion in the absence of calgranulin A is 1, 3 μ M of calgranulin A remarkably increased the amount of lactoferrin secretion to about six times. Calgranulin B increased lactoferrin secretion of neutrophils when the amount of addition is increased so as to increase the calgranulin activity (Figure 4). Assuming that the amount of lactoferrin secretion in the absence of calgranulin B is 1, 3 μ M of calgranulin B remarkably increased the amount of lactoferrin secretion to about five times.

【0039】

Those results show that change in the amount of

calgranulin A or calgranulin B in neutrophils can remarkably change the amount of lactoferrin secretion. The results of examples 1 and 2 show that calgranulins are important proteins to control granule secretion of neutrophils.

【0040】

【Example 3】

<Method of screening a substance inhibiting or activating a granule secreting reaction by allowing the substance of object for screening to exist in the system in which the amount of elastase secretion from neutrophils is greatly increased by changing calgranulin activity>

A neutrophil suspension was prepared from blood collected from a human vein according to the method described in Biological Chemistry Experiment Lecture, second series, 8, Blood, the last volume, page 679-685). The neutrophil suspension (cell concentration; 1×10^7 cells/ml) was adjusted to a cell concentration of 1×10^7 cells/ml using PB in a plastic test tube and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 10 minutes. Digitonin was added to the neutrophil suspension to a final concentration of 5 μ g/ml and the mixture was incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 15 minutes. The neutrophil suspension was centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes.

【0041】

After supernatant was discarded, neutrophils were re-suspended in PB to prepare a permeabilized neutrophil suspension (cell concentration: 1×10^7 cells/ml). The permeabilized neutrophil suspension was distributed to a 96-

well immunoplate and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 5 minutes.

The substance for screening was added to the immunoplate to a concentration of 30 μ M, and the mixture was incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 5 minutes.

【0042】

CaCl₂ and calgranulin A were added to the well of the 96-well immunoplate to final concentrations of 1 μ M and 3 μ M, respectively, and the resulting mixture was incubated at 37°C for 5 minutes. The 96-well immunoplate was centrifuged at 1200 rpm for one minute at 4°C (using a centrifuge for immunoplate). The supernatant is distributed to another 96-well immunoplate, and incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 5 minutes. 10 mM of an elastase substrate (Suc-Ala-Pro-Ala-pNA) was added to the 96-well immunoplate. After gently shaking, the mixture was incubated in a incubator controlling temperature and humidity at 37°C for 30 minutes. Then, absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader.

【0043】

Results: The results are shown in Table 1. The secretion inhibiting rate of test substances of object for screening was determined by comparison with a control which does not contain the test substances, assuming that the secretion of the control is 100%. Compound 1 and Compound 2 remarkably inhibited granule secretion in a system in which the activity of calgranulin A was increased and the amount of elastase

secretion from neutrophils has been remarkably increased. Compound 3 remarkably increased the amount of secretion in the above system.

【0044】

【Table 1】

test substances	secretion inhibiting rate (%)
Control	100
Compound 1	61
Compound 2	51
Compound 3	151

Compound 1: N-(4-methoxybenzyl)-N-(4-methoxyphenyl)-7-piperazinylheptylamine trihydrochloride

Compound 2: N-benzyl-N-(4-methoxyphenyl)-7-piperazinyl heptylamine trihydrochloride

Compound 3: 1,1-(di-4-hydroxyphenyl)-2-ethyl-1-octaene

【0045】

【Effects of the Invention】

The method of the present invention is very useful as a method of controlling granule secretion of neutrophils. The screening method for screening drugs inhibiting or activating the granule secreting reaction based on the above method is very useful in providing therapeutic drugs for various diseases due to intimal injury of blood vessels brought about by granules secretion of neutrophil.

【Brief Description of the Drawings】

【figure 1】

Figure 1 shows an elastase secretion reaction of human neutrophils having high permeability cell membranes by

calgranulin A.

【figure 2】

Figure 2 shows an elastase secretion reaction of human neutrophils having high permeability cell membranes by calgranulin B.

【figure 3】

Figure 3 shows an lactoferrin secretion reaction of human neutrophils having high permeability cell membranes by calgranulin A.

【figure 4】

Figure 4 shows a lactoferrin secretion reaction of human neutrophils having high permeability cell membranes by calgranulin B.

[Document Name] Abstract

[Abstract]

[Problems] To provide method of controlling secretion of granules.

[Means to be solved] A method of controlling granule secretion comprising performing a treatment to increase or decrease an activity of calgranulin on a cell line having granules secretion capability, thereby increasing or decreasing granule secretion from the cell line, and a method of screening drugs which inhibit or activate a granule secreting reaction based on the above control method.

[Effect] The method of the present invention is very useful as a method of controlling granule secretion of neutrophils. The screening method for screening drugs inhibiting or activating the granule secreting reaction based on the method aforementioned is very useful in providing therapeutic drugs for various diseases due to intimal injury of blood vessels brought about by granules secretion of neutrophil.

[Selected Drawing] Non

